

NATALIA



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO

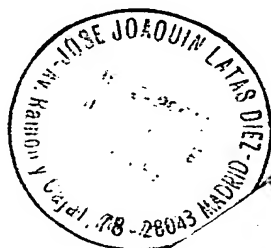


Oficina Española
de Patentes y Marcas

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200101710, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 20 de Julio de 2001.

Madrid, 10 de Mayo de 2004



El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

CAR.

MEN LENCE REIJA

INSTANCIA DE SOLICITUD

MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NUMERO DE SOLICITUD

P200101710

01 JUL 20 11:11

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO Ó.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:

CÓDIGO

MADRID

28

SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL
CONSEJO SUPERIOR INVESTIG. CIENTÍFICAS

NOMBRE

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA

CÓDIGO PAÍS

ES

DN/CIF

Q28/18002D

CNAE

PYME

5

(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO SERRANO, 117

LOCALIDAD MADRID

PROVINCIA MADRID

PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Dpto. 301 - 1.ª PLANTA
Paseo de la Castellana, 142
28046 MADRID

TELÉFONO 91 585 50 00

FAX 91 585 52 87

CORREO ELECTRÓNICO

CÓDIGO POSTAL 28006

CÓDIGO PAÍS ES

CÓDIGO PAÍS ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO

ANDREU MORALES

DÍAZ PEREIRA

BARASOAIN BLASCO

JOSÉ MANUEL

JOSÉ FERNANDO

MARÍA ISABEL

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

PAÍS

ES

ES

ES

(8)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVEN. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCIÓN:

METODO DE DETECCION Y EVALUACION DE COMPUESTOS MIMETICOS DE PACLITAXEL

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO

PAÍS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

☒

(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLENENSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

PEDRO OJEDA GARCÍA, CALLE SERRANO, 113 - 28006 MADRID

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN Nº DE PÁGINAS: 18

☒ Nº DE REIVINDICACIONES: 2

☒ DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS: 2

☐ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS:

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD

☐ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☒ OTROS: AUTORIZACIÓN

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO

MOD. 3101 - 3 - EJEMPLAR PARA MECANIZACIÓN



12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

21 NÚMERO DE SOLICITUD
P 2001017

31 NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

32 FECHA

33 PAÍS

22 FECHA DE PRESENTACIÓN

62 PATENTE DE LA QUE ES
DIVISORIA

71 SOLICITANTE (S)

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

DOMICILIO SERRANO, 117 - 28006 MADRID

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

72 INVENTOR (ES) JOSÉ MANUEL ANDREU MORALES, JOSÉ FERNANDO DÍAZ PEREIRA Y MARÍA ISABEL BARASOAIN BLASCO

51 Int. Cl. 7

G 01 N 33/50

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

54 TÍTULO DE LA INVENCION

METODO DE DETECCION Y EVALUACION DE COMPUESTOS
MIMETICOS DE PACLITAXEL

57 RESUMEN

METODO DE DETECCION Y EVALUACION DE COMPUESTOS MIMETICOS DE PACLITAXEL.

Una gran parte de los citostáticos, entre ellos paclitaxel (Taxol ®) y otras sustancias recientemente descubiertas que mimetizan sus efectos antitumorales, tienen como diana los microtúbulos celulares. La presente invención es un ensayo homogéneo de alto rendimiento, basado en la utilización de microtúbulos estabilizados y taxoides fluorescentes, para detectar cualesquiera sustancias que puedan sustituir al paclitaxel en su sitio de unión en los microtúbulos, y constituir potencialmente agentes anticancerosos.

TITULO:

METODO DE DETECCION Y EVALUACION DE COMPUESTOS MIMETICOS DE PACLITAXEL.

SECTOR DE LA TECNICA:

- 5 Sector farmacéutico. Agentes antitumorales. Ensayo homogéneo de alto rendimiento para la detección de sustancias que puedan sustituir a paclitaxel en su sitio de unión en los microtúbulos y por tanto con actividad potencial como agentes antitumorales.

ESTADO DE LA TECNICA:

- 10 El paclitaxel (Taxol ®), un compuesto muy empleado en la quimioterapia del cáncer, presenta como otros agentes anticancerosos, efectos secundarios. Este compuesto diterpenoide se extrajo originalmente de la corteza de una planta, *Taxus brevifolia*, de crecimiento lento, lo que conllevaba un problema de falta de una fuente barata y disponible de paclitaxel. El paclitaxel utilizado
- 15 actualmente es un producto de semisíntesis a partir de un precursor extraído de la hoja del tejo. Además, el paclitaxel presenta problemas de extrema insolubilidad. Por lo tanto, aunque el paclitaxel es un agente quimioterapéutico con una muy importante actividad biológica, el descubrimiento de nuevas fuentes de paclitaxel o bien de compuestos miméticos de paclitaxel tiene una
- 20 decisiva utilidad.
- El paclitaxel promueve el ensamblaje de $\alpha\beta$ -tubulina en microtubulos por unión preferencial a tubulina ensamblada más que a la tubulina no ensamblada. Su efecto está relacionado con el del nucleótido GTP, con importantes diferencias. El GTP se une a un extremo del dímero de tubulina haciendo contacto con el
- 25 siguiente dímero a lo largo de cada protofilamento que forma el microtúbulo, mientras el paclitaxel se une a un lado de β -tubulina cerca del contacto con el siguiente protofilamento; en la α -tubulina, la zona correspondiente a la cavidad de unión a paclitaxel está ocupada por un bucle de la cadena peptídica (Nogales, E.). Los dímeros de tubulina sin ensamblar unen GTP y el sitio de
- 30 unión queda ocluido por el ensamblaje, mientras el sitio de unión a paclitaxel existe sólo en tubulina ensamblada. La hidrólisis de GTP permite el

desensamblaje y la regulación del sistema de microtúbulos, sin embargo, la activación de la tubulina por paclitaxel es permanente, estabilizando los microtúbulos.

La supresión de la dinámica de microtúbulos celular por paclitaxel es una causa principal de la inhibición de la división celular y de la muerte de las células tumorales (Jordan, M.A. y Wilson, L.). Un número de sustancias naturales diversas, incluyendo epotilonas (Bollag, D.M. et al), discodermolida (Ter Haar, E. et al), eleuterobina (Long, B.H. et al), y laulimalida (Mooberry, S.I. et al) imitan los efectos citotóxicos de paclitaxel, aparentemente uniéndose a su sitio en los microtúbulos. Cada una de estas sustancias fue descubierta con diferentes ensayos para actividades similares a la de paclitaxel.

Algunas patentes describen métodos para identificar compuestos con actividades semejantes a paclitaxel. En la patente americana US 5340724 (Upjohn Co.) se describe un método empleando células (Tax 2-4 CHO) dependientes de paclitaxel y detectando su crecimiento. La solicitud PCT WO9420134 (Universidad de Columbia) proporciona dos anticuerpos monoclonales producidos por dos hibridomas que son capaces de unirse a paclitaxel y a sus análogos, así como su utilización para determinar la presencia y cantidad de paclitaxel o sus derivados biológicamente activos. Otra solicitud PCT WO0056894 (Cytoclonal pharmaceuticals, Inc.), describe las secuencias de ADN que codifican la beta tubulina de distintas especies de hongos del género Pestalotiopsis, estos segmentos de ADN purificados se emplean para detectar compuestos con actividad antitumoral. Otra solicitud PCT WO 9953295 (Universidad de California), consiste en un método para la detección de agentes que modulan la despolimerización de los microtúbulos, poniendo en contacto microtúbulos polimerizados, una proteína que los despolimeriza y las sustancias a ensayar en presencia de ATP o GTP y detectando la formación de monómeros, dímeros u oligómeros de tubulina mediante diferentes métodos como cambio de fluorescencia (DAPI), centrifugación, etc.

Sin embargo, en contraste con otras dianas biológicas importantes, hasta ahora se carecía de un ensayo estándar para detectar y medir directamente otros

ligandos cualesquiera capaces de reemplazar a paclitaxel en su sitio de unión en los microtúbulos.

Los métodos basados en la luminiscencia son muy útiles para estos propósitos. Los derivados fluorescentes, hidrosolubles y activos, de paclitaxel unidos con un intermediario de alanina en la posición no esencial 7 (Souto, A.A. et al) son sondas específicas del sitio de unión de paclitaxel a los microtúbulos (Evangelio, J.A., et al). Estos taxoides fluorescentes se han usado principalmente para localizar sitios subcelulares de unión de taxoide citotóxico a microtúbulos del polo del huso y a centrosomas (Abal, M.A., et al), así como para medir la cinética rápida de unión y de disociación del sitio de paclitaxel, que está expuesto en microtúbulos (Díaz, J.F., et al).

El objeto primordial de esta invención es el desarrollo un ensayo fluorescente homogéneo de unión de ligando al sitio de paclitaxel en los microtúbulos, que permite la detección de alto rendimiento de nuevos miméticos de paclitaxel. El método se basa en la combinación de dos componentes, una diana y una sonda. La diana está constituida por microtúbulos ensamblados in vitro los cuales se estabilizan mediante entrecruzamiento químico y se conservan en nitrógeno líquido. Este método de conservación es novedoso. Como sonda se emplean derivados fluorescentes de paclitaxel, que se unen específicamente a los microtúbulos (patentes ES 2121549, ES 2105983, WO9719938, Consejo Superior de Investigaciones Científicas) (Díaz, J.F., et al).

Las aplicaciones de este método son: búsqueda de nuevos agentes antitumorales a partir de bibliotecas de extractos y compuestos naturales y sintéticos; evaluación de modificaciones químicas de series de compuestos existentes (incluyendo paclitaxel, epotilona, discodermolida, euterobina, laulimalida); valoración de contenido en taxanos activos en fuentes naturales; investigación biológica y oncológica.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

Descripción breve de la invención

El sitio de unión a paclitaxel de microtúbulos también une otros ligandos recientemente descubiertos con actividad antitumoral. En la presente invención se ha diseñado un ensayo homogéneo de alto rendimiento para la detección de biomiméticos de paclitaxel, basado en el desplazamiento del taxoide fluorescente 7-O-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonil)-L-alanil]Paclitaxel de su sitio de unión en soluciones diluidas de microtúbulos conservados.

El método de detección, objeto de la presente invención y que se reivindica, se basa en la combinación de los dos componentes, la diana, que consiste en los microtúbulos ensamblados in vitro que se estabilizan mediante entrecruzamiento químico y se conservan indefinidamente congelados en nitrógeno líquido hasta su utilización, este método de conservar los microtúbulos también se reivindica en la presente invención, y la sonda, que consiste en dicho derivado fluoresceinado de paclitaxel que se une específicamente a los microtúbulos.

El método consiste en la adición de las sustancias a ensayar (no fluorescentes) a múltiples alícuotas de una solución diluida de la diana y la sonda en microplacas multipocillo. Las sustancias a ensayar pueden ser los compuestos de las familias de discodermolida, eleuterobina, sarcoditina, epotilonas y paclitaxel. Este método también tiene aplicación para medir contenidos activos de tipo paclitaxel de fuentes naturales y para la detección de alto rendimiento de nuevos biomiméticos de paclitaxel.

La sonda unida a la diana posee un valor de anisotropía de fluorescencia mucho mayor que el de la sonda libre; el desplazamiento por cualesquiera sustancias competidoras de la interacción de la sonda (ligando de referencia) con la diana se detecta midiendo el descenso de anisotropía de la fluorescencia de la sonda con un lector de polarización de fluorescencia en microplacas. Alternativamente se utiliza el descenso de transferencia resonante de energía (RET) de la sonda unida a un ligando aceptor rodaminado, 7-O-[N-(4'-tetrametilrodamina-carbonil)-L-alanil-] Paclitaxel o el cambio de intensidad de fluorescencia de la sonda 7-O-[N-(4'-fluoresceincarbonil)-L-alanil-]

Paclitaxel. Este método tiene aplicación en el desarrollo de herramientas para la realización de ensayos en investigación oncológica y/o biológica.

También es objeto de la presente invención el método para conservar los microtúbulos indefinidamente. Este método consiste en dializar los microtúbulos entrecruzados contra un tampón de conservación y criopreservarlos.

Descripción detallada de la invención

Con el fin de establecer un ensayo eficaz de competición basado en fluorescencia para la unión de ligando al sitio de paclitaxel en los microtúbulos, se investigaron los cambios de las propiedades fluorescentes de la sonda 7-O-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonil)-L-alanil]Paclitaxel (Flutax-2; 10) sobre la unión específica a microtúbulos. El Flutax-2 se prefirió al análogo Flutax-1 con fluoresceína no fluorada por su superior fotoestabilidad y pK ácido (dando el di-

anión fuertemente fluorescente a valores de pH neutros). Se investigaron métodos de anisotropía de fluorescencia y de transferencia de energía de resonancia (RET), y medidas de intensidad de la emisión (con Flutax-1). Puesto que los microtúbulos se unen a Paclitaxel y a Flutax con gran afinidad, se necesitan bajas concentraciones de sitios de unión con el fin de detectar los competidores de afinidad inferior. Estos sitios de unión estabilizados por dilución fueron proporcionados por microtúbulos entrecruzados suavemente (ver Ejemplo; Evangelio, J.A. et al.; Diaz, J.F. et al.).

Validación de la sonda y diana. A) Medida de la unión específica de Flutax-2 a microtúbulos mediante anisotropía de fluorescencia y su cancelación por paclitaxel

La intensidad de fluorescencia de Flutax-2 cambia muy poco con la unión a microtúbulos. Hay un pequeño cambio en el máximo de excitación de 494nm a 495nm (punto isobéstico a 500nm) y un desplazamiento azul de emisión de 523nm a 520nm (no mostrado aquí, punto isobéstico a 525nm; Diaz, J.F. et al.). Sin embargo, la polarización de fluorescencia de Flutax-2 aumenta significativamente por la unión. Se compararon el espectro de anisotropía de excitación de una solución de sitios de microtúbulo-Flutax-2 50nM con el

espectro de una solución similar en la que los sitios de unión fueron bloqueados con un exceso de paclitaxel y con el del Flutax-2 libre. Tanto la anisotropía negativa de la banda 329nm como la anisotropía positiva de la transición de excitación de energía inferior (495nm) de la difluoro-fluoresceína son específicamente aumentados por unión de Flutax-2 a microtúbulos. Los valores de anisotropía determinados para la banda 495nm (emisión 520nm, tampón GAB que contiene glicerol, 25°C) fueron: Flutax-2 libre (50nm), $r_{\min} = 0,055$; en presencia de microtúbulos bloqueados con paclitaxel, $r = 0,060$; Flutax-2 específicamente unido a los microtúbulos, $r_{\max} = 0,29$ (el último se determinó por valoración de Flutax-2 50nm con concentraciones crecientes de microtúbulos). Estos cambios son consistentes con una fuerte inmovilización del fluoróforo por la unión. Además del anclaje de Flutax-2 a través de su resto paclitaxel, se ha propuesto una interacción del di-anion fluoresceína con un residuo catiónico de microtúbulos, posiblemente Arg 282 de β -tubulina (Evangelio, J.A. et al.; ver Fig. 10 en Díaz, J.F. et al.).

Una isoterma de unión de Flutax-2 a microtúbulos, determinada a partir del cambio de anisotropía del ligando, indica una constante de equilibrio de la unión con valor $K_b = 11,5 \pm 0,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ en tampón GAB-GDP a 25°C (no es significativamente diferente de los valores previamente determinados por centrifugación (Díaz, J.F. et al.). La unión de Flutax-2 a estas concentraciones es completamente anulada por paclitaxel $10\mu\text{M}$.

Basándose en estos resultados, en la observación de la capacidad de Flutax-2 de sustituir a ^3H -Paclitaxel de su sitio de unión, y en los resultados previos discutidos en un estudio cinético detallado (Díaz, J.F. et al.), Flutax-2 puede considerarse una sonda genuina del sitio de unión a paclitaxel de microtúbulos.

Validación de la sonda y diana. B) Detección de la unión de Flutax-2 a microtúbulos mediante transferencia de energía (RET) a otro taxoide fluorescente y su cancelación por paclitaxel.

Las distancias de mayor proximidad entre sitios de unión a paclitaxel en subunidades de β -tubulina de microtúbulos son ca. 5,5, 8 y 9,5nm (Nogales, E., et al.), un intervalo de distancia apropiado para RET desde fluoresceína a fluoróforos de rodamina. El desplazamiento del donador o aceptor de sus sitios

de unión por otro ligando no fluorescente suprimiría la emisión del aceptor por excitación del donador. El espectro de emisión (excitación a 460nm) de sitios de unión de microtúbulos 50nM con Flutax-2 10nM y Rotax 40nM (7-O-[N-(4'-tetrametilrodamina-carbonil)-L-alanil-] Paclitaxel (Evangelio, J.A. et al) mostró un pico de emisión sensibilizada de Rotax, además de la emisión de Flutax-2 . Cuando los sitios de unión se bloquearon con paclitaxel la emisión de fluoresceína aumentó (no se apagó) y cambió de 521 a 524 nm, mientras la contribución de rodamina decreció a un nivel (un hombro) que era similar al de la emisión no sensibilizada de Rotax a 582nm. Este experimento indicó la posibilidad de detectar una unión de ligando al sitio de paclitaxel por el decrecimiento de RET.

Validación de la sonda y diana. C) Detección de la unión de Flutax-1 a microtúbulos mediante transferencia de energía (RET) a otro taxoide fluorescente y su cancelación por paclitaxel.

Utilizando Flutax-1 es posible caracterizar el desplazamiento por variación de la intensidad de fluorescencia.

Ensayo fluorescente de detección y evaluación de ligandos que interaccionan con el sitio de unión de paclitaxel en los microtúbulos.

Usando Flutax-2 como una sonda de referencia del sitio de unión a paclitaxel, la unión de otros ligandos no fluorescentes que desplazan Flutax-2 de los microtúbulos (ver Figura 1) puede medirse fácilmente por los cambios en sus propias propiedades de fluorescencia en un ensayo de competición. Se ha empleado el cambio en la anisotropía de fluorescencia, que fue analizado en placas de 96 pocillos con un lector de microplaca. La Figura 2 muestra cómo el paclitaxel y el docetaxel disminuyen eficazmente la anisotropía de fluorescencia de soluciones de Flutax-2 50nM- sitios de microtúbulos 50nM. El análisis numérico de las isothermas de desplazamiento (ver Ejemplo) indicó que paclitaxel y docetaxel se unen a microtúbulos con constantes de unión de equilibrio de $(3,7 \pm 1,5) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (4 determinaciones) y $(6,0 \pm 2,3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (2 determinaciones) respectivamente a 25°C. La relación de afinidades de docetaxel a paclitaxel fue $2,7 \pm 0,2$ a partir de los experimentos individuales. Una afinidad 2 veces mayor de docetaxel comparado con paclitaxel está de

acuerdo con una determinación directa previa (Díaz, J.F. y Andreu, J.M.). La afinidad de paclitaxel es del mismo orden de magnitud que los valores previamente determinados para paclitaxel (Parness, J. y Horwitz, S.B.), 2-debenzoil-2-(m-aminobenzoil) paclitaxel (Han, Y., et al.) y 3'-N-m-aminobenzamido-3'-N-debenzamido-Paclitaxel (Li, Y. et al.). La baccatina III, generalmente considerada hasta ahora como un compuesto inactivo, inhibió completamente la anisotropía de microtúbulo Flutax-2, aunque a concentraciones totales aproximadamente 200 veces más grandes que paclitaxel (ver Fig. 1). El análisis de los datos de desplazamiento indicó que baccatina III es reconocida por el sitio de unión a paclitaxel de microtúbulos con una constante de equilibrio de $(1,5 \pm 0,5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (7 determinaciones). Baccatina III es equivalente al sistema de anillo taxano, en el que el grupo C-13 OH sustituye a la cadena lateral de paclitaxel (ver estructuras químicas en la Fig. 2). La cadena lateral C-13 ha sido considerada previamente como un determinante esencial para el reconocimiento de paclitaxel. Sin embargo, el éster metílico de la cadena lateral C-13 fue, dentro de su límite de solubilidad, inactivo para desplazar a Flutax-2. Los resultados indicaron una constante de equilibrio de unión inferior a 10^3 M^{-1} para este análogo de la cadena lateral C-13 separado del resto de la molécula (ver Fig. 2; 2 determinaciones).

En una serie de medidas de control, el desplazamiento de la interacción de ^3H -paclitaxel con microtúbulos por baccatina III y Flutax-2 se evidenció por sedimentación y conteo de centelleo. Los resultados de estas mediciones (ver Ejemplo) fueron compatibles con los de los ensayos de anisotropía de fluorescencia, excepto para una afinidad aparente 7-veces inferior de Flutax-2.

Esto confirmó que baccatina III se reconoce por el sitio de unión a paclitaxel de microtúbulos. Sin embargo, con el fin de tener la mayoría del trazador radiactivo ^3H -paclitaxel en solución, en vez de adsorberse al tubo de policarbonato de la ultracentrífuga de mesa, fue necesario incluir 1 mg mL^{-1} de seroalbúmina bovina, que une paclitaxel (manteniéndolo disponible para la interacción con microtúbulos) así como Flutax-2 (disminuyendo su afinidad aparente). Estos procesos de adsorción imposibilitan una medida rigurosa directa de la afinidad de la unión a paclitaxel a microtúbulos en nuestras

manos, y por tanto de la afinidad de sus competidores usando paclitaxel como un ligando de referencia en estos ensayos diluidos. Las desventajas adicionales de los ensayos de unión de ^3H -paclitaxel en comparación con el ensayo homogéneo de anisotropía de taxoide fluorescente, son las operaciones de centrifugación, separación y medición radioactiva, requeridas.

Utilización del ensayo de anisotropía de fluorescencia en microplaca en comparación con otros métodos para detectar miméticos de paclitaxel.

El método fluorescente de detección de unión de ligandos al sitio paclitaxel de microtúbulos desarrollado en este trabajo constituye un primer ensayo homogéneo para cualquier otra sustancia que actúe sobre este importante blanco antitumoral. Su simplicidad se compara favorablemente con métodos de cribaje (screening) basados en la estabilización de microtúbulos (Bollag, D.M., et al.; www.cytoskeleton.com) y con los ensayos competitivos que utilizan Paclitaxel marcado radiactivamente (más arriba, Bollag, D.M. et al.; Diaz, J.F. y Andreu, J.M.). Los anticuerpos monoclonales específicos de taxano ofrecen sensibilidad posiblemente insuperable para la determinación de contenidos de fármacos y compuestos estrechamente relacionados (Grothaus, P.G., et al.; O'Boyle, K.P.; Bicomumpaka, C. y Page, M.), sin embargo, pueden fallar en reconocer ligandos no relacionados químicamente del sitio de unión a paclitaxel del microtúbulo. Puesto que se pueden analizar fácilmente múltiples muestras con el método de polarización por fluorescencia, este ensayo constituye una herramienta útil para la evaluación de la afinidad de unión de compuestos recientemente diseñados de las familias de discodermolida, eleuterobina, epotilonas y paclitaxel. También es aplicable a la medición de contenidos activos tipo paclitaxel de fuentes naturales, y para la investigación de alto rendimiento de nuevos biomiméticos de paclitaxel, en un modo complementario de las exploraciones celulares para inhibidores mitóticos, como los utilizados en el descubrimiento de monastrol (Mayer, T.U., et al.). Una propiedad interesante del ensayo de anisotropía de fluorescencia es su sensibilidad para la detección de ligandos de afinidad media. Ello es posible por la combinación de un taxoide altamente fluorescente (Flutax-2) con microtúbulos estabilizados, permitiendo la gran dilución necesaria para el desplazamiento efectivo de la sonda por

ligantes más débiles, que de otra forma no se detectarían. Un ejemplo es la detección de la unión de baccatina III, que proporciona una nueva visión del reconocimiento molecular de paclitaxel por microtúbulos.

5 BIBLIOGRAFIA

- Abal, M.A., Souto, A.A., Amat-Guerri, F., Acuña, A.U., Andreu, J.M. y Barasoain, (2001) *Cell Motil. Cytosk.* 49, 1-15
- Andreu, J.M., Perez-Ramirez, B., Gorbunoff, M.J., Ayala, D. y Timasheff, S.N. (1998) *Biochemistry* 37, 8356-8368.
- 10 Bicomumpaka, C. y Page, M. (1998) *J. Immunol. Meth.* 212, 1-7.
- Bollag, D.M., McQueney, P.A., Zhu, J., Henses, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Diaz, J.F. y Andreu, J.M. (1993) *Biochemistry* 32, 2747-2755.
- Díaz, J.F., Strobe, R., Engelborghs, Y., Souto, A.A. y Andreu, J.M. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 26265-26276
- 15 Evangelio, J.A., Abal, M., Barasoain, I., Souto, A.A., Lillo, M.P., Acuña, A.U., Amat- Guerri, F., y Andreu, J.M. (1998) *Cell Motil. Cytoskel.* 39, 73-90.
- Grothaus, P.G., Bignami, G.S., O'Malley, S., Harada, K.E., Byrnes, J.B., Waller, D.F., Raybould, T.J., McGuire, M.T. y Alvarado, B. (1995) *J. Nat. Prod.* 58, 1003-1014.
- 20 Han, Y., Chaudhary, A.G., Chordia, M.D., Sackett, D.L., Perez-Ramirez, B., Kingston, D.G. y Bane S. (1996) *Biochemistry* 35, 14173-14183
- Jimenez-Barbero, J., Souto, A.A., Abal, M., Barasoain, I., Evangelio, J.A., Acuña, A.U., Andreu, J.M., y Amat-Guerri, F. (1998) *Bioorg. Med. Chem.* 6, 1857-1863.
- 25 Jordan, M.A. y Wilson, L. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 123-130
- Lackowicz J.R. (1999) *Principles of fluorescence spectroscopy.* Kluwer/ Plenum, New York, N.Y.
- Li, Y., Edsall, R. Jr., Jagtap, P.G., Kingston, D.G.I., y Bane, S. (2000) *Biochemistry* 39, 616-623
- 30 Long, B.H., Carboni, J.M., Wasserman, A.J., Cornell, L.A., Casazza, A.M., Jensen, P.R., Lindel, T., Fenical, W. y Fairchild, CR. (1998) *Cancer Res.* 58, 1111-1115.

Mayer, T.U., Kapoor, T.M., Haggarty, S.J., King, R.W., Schreiber, S.L. y Mitchison, T.J. (1999) *Science* 286, 971-974

Medrano, F.J., Andreu, J.M., Gorbunoff, M.J. y Timasheff, S.N. (1991) *Biochemistry* 30, 3770-3777.

5 Mooberry, S.I., Tien, G., Hernandez, A.H., Plubrukarn, A. y Davidson, B.S. (1999) *Cancer Res.* 59, 653-660

Nogales, E. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* 69, 277-302

Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A. y Downing, K.H. (1999) *Cell* 96, 79-88.

10 Nogales, E., Wolf, S.G. y Downing, K. (1998) *Nature* 391, 199-203.

O'Boyle, K.P., Wang, Y., Schwarz, E.L., Regl, D.L., Einzig, A., Dutcher, J.P., Wiernik, P.H. y Horwitz, S.B. (1997) *Cancer* 79, 1022-1030 Parness, J. and Horwitz, S.B. (1981) *J. Cell. Biol.* 91, 479-487.

Souto, A.A., Acuña, A.U., Andreu, J.M., Barasoain, I., Abal, M., y Amat-Guerri, F. (1995) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34, 2710-2712.

15 Ter Haar, E., Kowalsky, R.J., Lin, C.M., Longley, R.E., Gunasekera, S.P., Rosenkranz, H.S., y Day, B.W. (1996) *Biochemistry* 35, 243-250.

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS FIGURAS

20 **FIGURA 1.** Una micrografía de fluorescencia de una mezcla de reacción típica utilizada en esta invención, que consiste en microtúbulos estabilizados (sitios de taxoide 100nM) y Flutax-2 taxoide fluorescente (100nM). La barra indica 10µm.

25 **FIGURA 2.** Isotermas de competición de ligandos que se unen al sitio de paclitaxel de microtúbulos en tampón GAB-GDP a 25°C. La anisotropía de fluorescencia de soluciones múltiples de Flutax-2 50nM y sitios de unión de microtúbulos 50nM con diversas concentraciones de competidores se midió por duplicado, utilizando un lector de microplaca. Los círculos sólidos, paclitaxel
30 (1); los círculos vacíos, docetaxel; los cuadrados, baccatina III (2), los triángulos, éster metílico de la cadena lateral C-13 de paclitaxel (3); las cruces, controles correspondientes con DMSO 1% (v/v) sin ligando. En este ensayo,

cada curva de competición comienza con un valor de anisotropía correspondiente a dos tercios de moléculas de Flutax-2 unidas, que se reducen progresivamente por el competidor que sustituye a Flutax-2 en los sitios de unión. La constante de equilibrio de unión de Flutax-2 es $1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Las

5 líneas 1 (discontinua corta) y 2 (continua) corresponden a los mejores ajustes para la unión de paclitaxel y baccatina al mismo sitio con valores de constante de equilibrio de $K = 3,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ y $K = 1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ respectivamente; la línea larga discontinua es el ajuste a los datos de docetaxel, $K = 8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$; la línea de puntos que pasa a través de los datos del éster metílico de cadena lateral es

10 una simulación de una unión de afinidad baja con $K = 7 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (obsérvese que estos últimos datos son similares a los de los controles).

EJEMPLO DE REALIZACION DE LA INVENCION

1. Taxoides. Sonda fluorescente.

15 Se prepararon soluciones de serie concentradas y se mantuvieron a -20°C en ambiente seco. El paclitaxel (del National Cancer Institute, Bethesda, MD) se midió espectrofotométricamente a 273nm después de dilución en metanol, usando un coeficiente de extinción de $1.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Díaz, J.F. y Andreu, J.M.). ^3H -Paclitaxel (4 Ci mmol^{-1}) se obtuvo de Moravsek Biochemicals (Brea,

20 CA). Docetaxel (Taxotere) fue proporcionado por Rhône-Poulenc Rorer (Antony, France). Baccatina III se obtuvo de Sigma; se encontró desprovisto de impurezas por HPLC (un gradiente 20-80% de acetonitrilo en ácido trifluoroacético acuoso al 0,05%, en una columna C-18, monitorizado a 228nm). Un coeficiente de extinción de baccatina III determinado aproximadamente fue

25 $900 \pm 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (273nm, metanol). Baccatina III era soluble a las concentraciones utilizadas en fosfato sódico 10mM, etilenglicol bis (β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetracético (EGTA) 1mM, GTP 0,1mM, MgCl_2 6mM, glicerol 3,4 M, (tampón GAB) pH 6,5 con DMSO al 1%. El éster metílico de la cadena lateral C-13 de paclitaxel fue proporcionado por E. Baloglu y D.G.I.

30 Kingston del Virginia Polytechnic Institute (Blacksburg, VA). La absortividad molar de este compuesto es de alrededor de $750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 273nm (cola de absorción, metanol) y era soluble a 0,75mM en tampón GAB-DMSO 1%.

Obsérvese que las absortividades 273nm añadidas de baccatina III y el éster metílico de la cadena lateral eran aproximadamente las de paclitaxel. F. Amat-Guerri, del Instituto de Química Orgánica, CSIC (Madrid, España) proporcionó la sonda fluorescente Flutax-2; se comprobó su pureza con HPLC y se determinó su concentración espectrofotométricamente con dodecil sulfato de sodio al 0,5% (SDS), a pH neutro, usando un coeficiente de extinción de $49,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 496nm (Díaz, J.F., et al.).

2. Diana: microtúbulos entrecruzados.

Se purificó y almacenó tubulina de cerebro bovino, y se midió su concentración como se ha descrito (Andreu, J.M., et al.). Antes de su utilización se equilibró en fosfato sódico 10mM, EGTA 1mM, GTP 0,1mM, glicerol 3,5M pH 6,8, con una columna de gravedad de Sephadex G-25 en frío, y se centrifugó 10 min. a 50.000 en un rotor TLA 100,4 en frío (Beckman). La tubulina $50\mu\text{M}$ se hizo 6mM en MgCl_2 (es decir tampón de ensamblaje de glicerol GAB, pH final 6,5) y GTP 1mM, se ensambló en microtúbulos a 37°C y estos se entrecruzaron suavemente con glutaraldehído 20mM, deteniendo la reacción con NaBH_4 como se ha descrito (Díaz, J.F., et al.). Estos microtúbulos entrecruzados tienen la misma especificidad, cinética, y estequiometría de unión de Flutax-2, que los controles no entrecruzados; tienen una morfología normal bajo el microscopio electrónico (Díaz, J.F., et al.). Los microtúbulos entrecruzados se dializaron contra GAB-0,1 mM nucleótido (GTP o GDP) durante más de 16h en frío en cassetes de diálisis (Pierce) y se conservaron congelados gota a gota bajo nitrógeno líquido, o bien a 4°C con 0,05% de azida sódica. Este método de conservación de los microtúbulos entrecruzados, mediante diálisis contra un tampón de conservación y criopreservación se reivindica en la presente invención.

Su concentración de tubulina total se midió después de diluirlos en SDS al 1% utilizando un coeficiente de extinción de $107,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 275nm (Díaz, J.F. y Andreu, J.M.). La concentración de la tubulina unida se determinó por sedimentación y se encontró que era típicamente 80%-90% del total. La concentración de sitios de unión de taxoide se determinó por adición de concentraciones crecientes de microtúbulos entrecruzados a Flutax-2 $5\mu\text{M}$ en

el tampón GAB-GDP, sedimentación (Díaz, J. F., et al.), 50.000 rpm en un rotor Beckman TLA 120 a 25°C) y medición espectrofotométrica de Flutax-2. Se observó que las preparaciones de microtúbulos entrecruzados unían 0,75 \pm 0,05 de Flutax-2 por tubulina total (es decir, como mínimo el 95% de la tubulina unida era activa uniendo este ligando). Las mediciones de control utilizando ^3H -paclitaxel y centelleo líquido dieron valores similares a Flutax-2. Una vez que se determinaron los valores de anisotropía de Flutax unido a microtúbulo y libre, el número de sitios pudo también determinarse por valoración de soluciones diluidas de microtúbulos entrecruzados con Flutax-2 (véase mas abajo). La concentración de sitios de unión de taxoides de las preparaciones de microtúbulos entrecruzados resultó estable bajo nitrógeno líquido, decayendo a velocidades comprendidas entre 0,02 y 0,05 día⁻¹ a 4°C (vidas medias de cinco y dos semanas respectivamente). Se utilizaron los microtúbulos entrecruzados dentro de una vida media a partir de la preparación. Una micrografía de fluorescencia de estos microtúbulos con Flutax-2 se muestra en la Fig.1.

3. Mediciones de espectroscopia de fluorescencia y anisotropía.

Se obtuvieron espectros de fluorescencia corregidos con un instrumento Fluorolog-3-221 de recuento de fotones (Jobin Yvon-Spex, Longjumeau, Francia), con un ancho de banda de emisión de 5nm y excitación de 1 μm , a 25°C. Las mediciones fluorométricas de concentración se realizaron con un espectrofluorómetro Shimadzu RF-540. Los espectros de anisotropía y las mediciones se recogieron en el modo formato-T de Fluorolog con excitación polarizada verticalmente y se corrigieron por la sensibilidad de cada canal con excitación polarizada horizontalmente (Lackowicz J.R.). Las mediciones múltiples de anisotropía, se realizaron con un lector de microplaca PolarStar (BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania) a 25°C. Las soluciones se excitaron con 200 pulsos de luz polarizada verticalmente (filtro de paso de banda 485-P, 480-492nm) y la emisión se analizó simultáneamente con filtros de polarización vertical y horizontal (paso de banda 520-P, 515-550nm). La sensibilidad de los dos canales se ajustó para dar el valor de anisotropía de Flutax-2 libre (0,055, polarización 0,080; tampón GAB a 25°C) en cavidades que contenían Flutax-2 y no microtúbulos. Los valores de blancos de pocillos

con microtúbulos y sin Flutax-2 se sustrajeron de los valores de intensidad de fluorescencia (los blancos representaron típicamente menos del 4% de la medición).

4. Unión de Flutax a microtúbulos.

Se valoró primero Flutax-2 (50nM) con concentraciones crecientes de sitios de unión proporcionados por microtúbulos entrecruzados, en tampón GAB a 25°C. La fracción de Flutax-2 unido es:

$$[F]_b / [F]_0 = (r - r_{\min}) / (r_{\max} - r_{\min}) \quad [1]$$

donde $[F]_b$ y $[F]_0$ son concentraciones totales y unidas de Flutax-2 respectivamente, r es anisotropía de fluorescencia medida con el espectrofluorómetro, el valor de r_{\min} es 0,055 y el valor de r_{\max} era una parámetro ajustable. Suponiendo una unión uno a uno, la concentración de sitios de unión libre $[S]$ es:

$$[S] = [S]_0 - [F]_b \quad [2]$$

y se aplica la siguiente expresión:

$$r = r_{\min} + (r_{\max} - r_{\min}) K_b [S] / (1 + K [S]) \quad [3]$$

La ecuación 3 se aplicó iterativamente para ajustar los datos r vs $[S]$, usando valores de partida diferentes de r_{\max} en las ecuaciones 1 y 2, con un programa basado en el algoritmo de Marquardt, de lo que se obtuvo el valor mejor fijado $r_{\max} = 0,29$. Las mediciones de control con sitios de unión de microtúbulos bloqueados por 10 μ M paclitaxel dieron valores r muy cercanos a r_{\min} , dentro de un intervalo $[S]_0$ de 0 a 100 nM. Los microtúbulos entrecruzados (50-100nM de tubulina total) se valoraron después con concentraciones conocidas de Flutax-2. La unión se determinó como:

$$[F]_b / [T]_0 = [F]_0 (r - r_{\min}) / [T]_0 (r_{\max} - r_{\min}) \quad [4]$$

donde $[T]_0$ es la concentración de tubulina total, y r_{\max} y r_{\min} tienen los valores determinados previamente. La concentración de Flutax-2 libre es:

$$[F] = [F]_0 - [F]_b \quad [5]$$

La ecuación de unión para sitios independientes

$$[F]_b / [T]_0 = n K_b [F] / (1 + K_b [F]) \quad [6]$$

se ajustó iterativamente a los datos con un programa basado en el algoritmo de Marquardt, con el fin de obtener los mejores valores fijados de n , el número de

sitios de unión de Flutax-2 por tubulina total, y K_b , y la constante de equilibrio de unión. Cuando se repitieron estos procedimientos usando el lector de placa de polarización, en vez del espectrofluorómetro, se obtuvieron unos valores r_{max} de 0,245 (con placas Costar 3599) y 0.27 (con placas negras Nunc 267342) y valores K_b y n dentro del error experimental.

5. Mediciones de unión de ligando al sitio de unión a paclitaxel de microtúbulos por desplazamiento de Flutax-2.

Estas mediciones competitivas se realizaron con el lector de polarización en placa. Una solución de concentraciones conocidas de sitios de unión de microtúbulo y Flutax-2, ambas próximos a 50nM, en tampón GAB-GDP se preparó reciente a partir de las reservas concentradas de microtúbulos entrecruzados y Flutax-2. Se dispensó en alícuotas de 200 μ L (volumen final) a temperatura ambiente en placas con 96 cavidades (Costar cat. nº 3599, no se utilizaron las cavidades de los bordes). Las placas se seleccionaron comprobando que Flutax-2 permanecía en solución, en vez de adsorberse al poliestireno, midiendo los contenidos de las cavidades en el espectrofluorómetro (recuperación del 90%). Los ligandos a ensayar se añadieron en volúmenes pequeños de DMSO (concentración de DMSO final 2% v/v) para hacer las concentraciones duplicadas deseadas. También se comprobó que el paclitaxel no se adsorbía a la placa durante el ensayo, empleando 3 H-Paclitaxel y un contador de centelleo. Las cavidades sin proteína y sin Flutax-2 se incluyeron para mediciones de calibrado y de fondo respectivamente (véase las medidas de anisotropía más arriba). Las placas se agitaron por rotación durante 10 minutos y se midieron 2 veces dentro de 30-90 minutos después de equilibrado a 25°C en el lector de microplaca. Los datos de anisotropía de Flutax-2 se calcularon con el software de evaluación (BMG) y se trazaron versus la concentración total de competidor.

Con el fin de medir la afinidad de unión de un ligando (L) que desplaza el ligando de referencia Flutax-2 de su sitio de unión de microtúbulo (S), se asumió estequiometría unitaria, determinándose la unión fraccionaria de Flutax-2 a partir de la anisotropía como

$$[F]_b / [S]_0 = [F]_0 (r - r_{min}) / [S]_0 (r_{max} - r_{min}) \quad [8]$$

y se aplicaron las siguientes expresiones:

$$K(F) = [SF] / [S][F] \quad [9]$$

$$K(B) = [SB] / [S][B] \quad [10]$$

$$[F] = [F]_0 - [SF] \quad [11]$$

$$[L] = [L]_0 - [SL] \quad [12]$$

$$[S] = [S]_0 - [SL] - [SF] \quad [13]$$

Un programa de ordenador personal, que implementaba la solución a las ecuaciones (9-13) a partir de los valores conocidos de $[F]_0$, $[L]_0$, $[S]_0$ y $K(F)$, se utilizó para encontrar el mejor valor de ajuste por mínimos cuadrados de la constante de unión de equilibrio del ligando competidor $K(L)$ a los datos $[F]_b/[S]_0$ versus $[L]_0$ (Medrano, F.J., et al.; J.F. Díaz, programa sin publicar Equigra.4). La curva de desplazamiento ajustada se expresó como anisotropía y se trazó junto con los datos (ver Fig. 2).

6. Desplazamiento de 3H Paclitaxel de los microtúbulos por ligandos competidores.

3H Paclitaxel 100nM, sitios de unión de microtúbulos 100nM y la concentración deseada de competidor en un volumen final de 200 μ L de tampón GAB-GDP que contenía 1 mg mL⁻¹ de albúmina de suero bovino (BSA) y DMSO al 1%, se incubaron durante 30 min. y se centrifugaron 10 min. a 50.000 rpm, 25°C, en tubos de policarbonato en un rotor TLA 100 con una ultracentrífuga TLX (Beckman, Palo Alto, CA). Los sobrenadantes y los tubos que contenían los sedimentos se separaron y se sometieron a recuento con un contador de centelleo líquido. Los datos pudieron tratarse numéricamente de modo similar a la sección de más arriba, sustituyendo Paclitaxel por Flutax-2.

REIVINDICACIONES

1. Método consistente en un ensayo homogéneo para la detección de cualesquiera sustancias antitumorales sustitutivas de paclitaxel en el sitio de unión de paclitaxel de los microtúbulos, caracterizado porque:
 - 5 - se basa en la combinación de una diana y una sonda,
 - se añaden las sustancias a ensayar a una solución de la diana que consiste en microtúbulos y la sonda fluorescente unida a la diana,
 - se determina el desplazamiento de las sustancias competidoras de la interacción de la sonda con la diana mediante la medida del descenso de
 - 10 anisotropía de la variación de intensidad de fluorescencia de la sonda o de la transferencia resonante de energía de la sonda a un aceptor adecuado.
 - y se identifica un compuesto biomimético de paclitaxel si se observa un descenso de la anisotropía de la fluorescencia de la sonda o mediante el
 - 15 descenso de transferencia resonante de energía de la sonda unida a un ligando.

2. Método según la reivindicación 1 caracterizado porque la diana de este método son microtúbulos ensamblados *in vitro* los cuales se estabilizan mediante entrecruzamiento químico y se conservan indefinidamente
- 20 mediante diálisis contra un tampón de conservación y criopreservación.

3. Método según las reivindicaciones 1 a la 2 caracterizado porque la sonda de este método son cualesquiera derivados fluorescentes de paclitaxel que se unen específicamente a los microtúbulos, incluyendo entre otros:

25 7-O-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonil)-L-alanil]Paclitaxel

7-O-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceinsulfonil)-L-alanil]Paclitaxel

7-O-[N-(4'-tetrametilrodaminicarbonil)-L-alanil]Paclitaxel

30 7-O-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonil)-L-beta-alanil]Paclitaxel

4. Método según las reivindicaciones 1 a la 3 caracterizado porque puede ser robotizado y porque las medidas se pueden realizar empleando lectores de fluorescencia en placa.
5. Uso del método según las reivindicaciones 1 a la 4 para la identificación de alto rendimiento (HTP) de compuestos antitumorales que actuen sobre el sitio de unión de paclitaxel en los microtubulos, provenientes de fuentes naturales o sintéticas.
10. Uso del método según las reivindicaciones 1 a la 5 para la evaluación de nuevos derivados de taxanos, epotilonas, discodermolida, eleuterobina, sarcodicitina y cualesquiera otros ligandos del sitio de unión de paclitaxel en los microtubulos.
15. Uso del método según las reivindicaciones 1 a la 6 para la evaluación del contenido en dichas sustancias activas de una fuente natural de producción.
20. Uso del método según las reivindicaciones 1 a la 7 para la evaluación de nuevas fuentes para la extracción o preparación de sustancias potencialmente activas a partir de precursores farmacológicamente no activos o semi-activos.
25. Uso del método según las reivindicaciones 1 a la 8 para el desarrollo de herramientas para la realización de ensayos en investigación oncológica y/o biológica relacionadas con los microtubulos celulares.

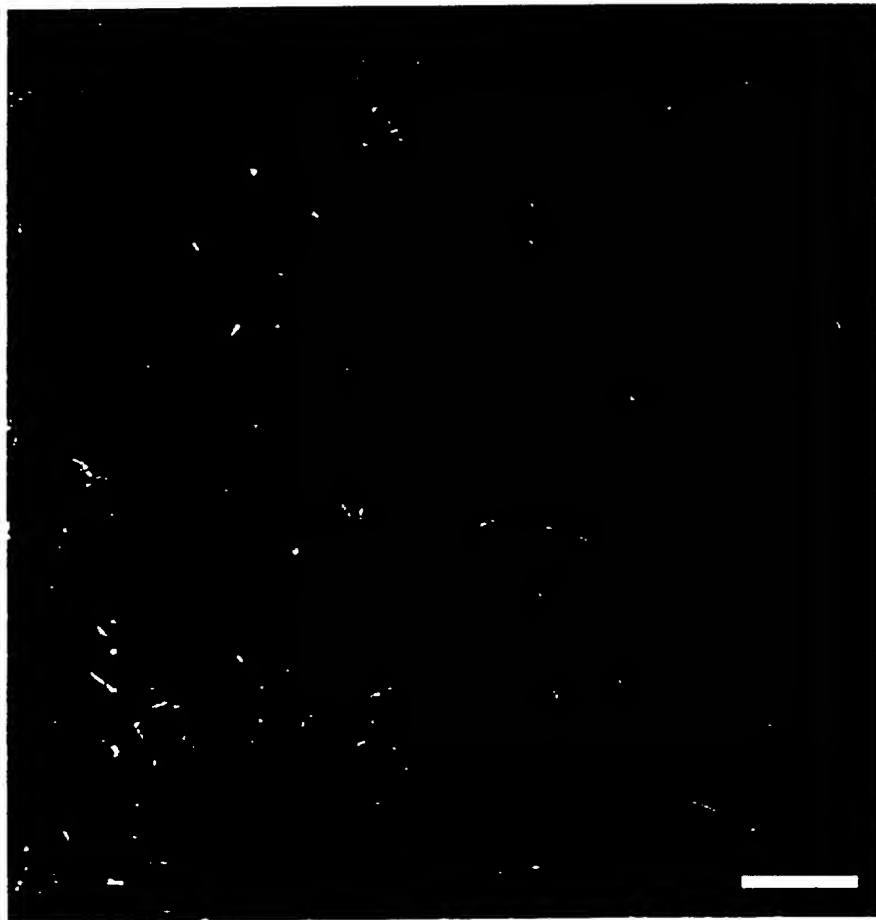
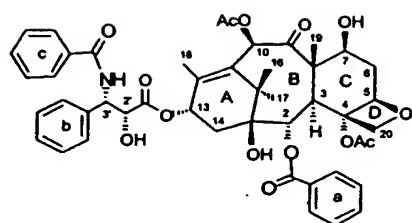
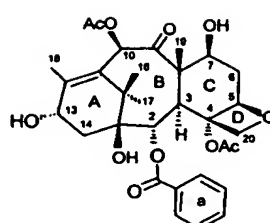


Figura 1



1 Taxol



2 baccatina III

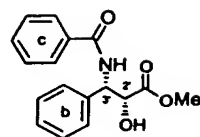
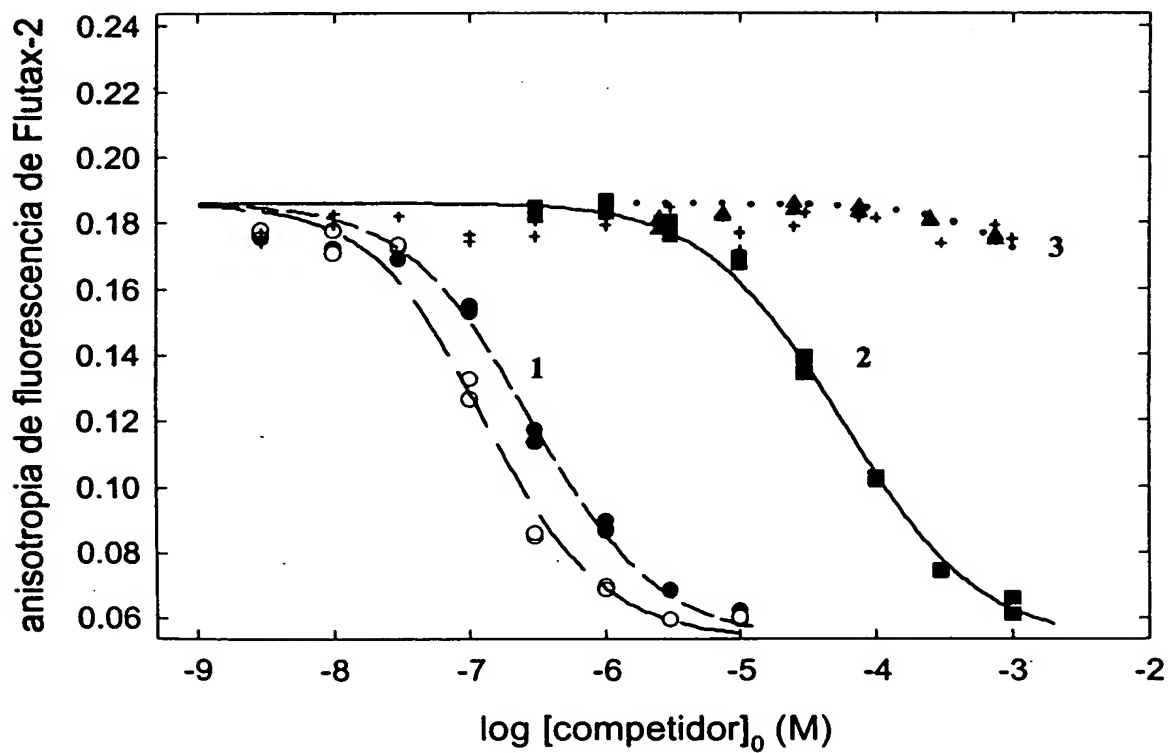
3 ester metílico de la
cadena lateral en C-13

Figura 2



MINISTRY
OF INDUSTRY, TOURISM
AND COMMERCE

Spanish Office
of Patents and Trademarks

OFFICIAL CERTIFICATE

I hereby certify that the attached documents are an exact copy of the application for INVENTION PATENT number 200101710, having date of filing in this Office of 20th July 2001.

Madrid, 10th May 2004

Manager of the Patents and
Information Technology Department
p.p.

CARMEN LENCE REIJA

MINISTRY OF
SCIENCE AND
TECHNOLOGY

Spanish Office
of Patents and Trademarks

APPLICATION PROCESS

APPLICATION NUMBER

P200101710

(1) CATEGORY
INVENTION PATENT UTILITY MODEL

DATE AND TIME OF FILING IN O.E.P.M.

(2) TYPE OF APPLICATION (3) MAIN OR ORIGIN FILE
CATEGORY
ADDITION TO PATENT APPLICATION
DIVISIONAL APPLICATION DATE OF APPLICATION
CHANGE OF CATEGORY
EUROPEAN PATENT APPLICATION TRANSFORMATION
PCT: NATIONAL PHASE ENTRY

DATE AND TIME OF FILING IN PLACE OTHER
THAN O.E.P.M.

(4) PLACE OF FILING CODE
MADRID **28**

(5) APPLICANTS: SURNAMES OR NAME NATIONALITY COUNTRY TAX OR IDENTITY CNAE PYME
COMPANY NAME CODE NUMBER
CONSEJO SUPERIOR INVESTIG. CIENTIFICAS **SPANISH** **ES** **Q-28/18002D** **5**

DETAILS OF FIRST APPLICANT

ADDRESS: **SERRANO, 117** TELEPHONE **91 585 50 00**
TOWN OR CITY: **MADRID** FAX **91 585 52 87**
PROVINCE: **MADRID** E-MAIL
RESIDENT COUNTRY: **SPAIN** POST CODE **28006**
NATIONALITY: **SPANISH** COUNTRY CODE **ES**
COUNTRY CODE **ES**

(7) INVENTOR(S): SURNAMES FIRST NAME NATIONALITY COUNTRY
CODE
ANDREU MORALES **JOSE MANUEL** **SPANISH** **ES**
DIAZ PEREIRA **JOSE FERNANDO** **SPANISH** **ES**
BARASOAIN BLASCO **MARIA ISABEL** **SPANISH** **ES**

(8) THE APPLICANT IS THE INVENTOR (9) METHOD OF OBTAINING THE RIGHT
☒ X THE APPLICANT IS NOT THE INVENTOR OR SOLE INVENTOR LABOUR INV. CONTRACT INHERITANCE

(10) TITLE OF THE INVENTION

DETECTION AND EVALUATION METHOD FOR MIMETIC COMPOUNDS OF PACLITAXEL

(11) DEPOSITION MADE OF BIOLOGICAL MATERIALS: YES X NO

(12) OFFICIAL EXPOSITIONS: PLACE DATE

(12) DECLARATION OF PRIORITY
COUNTRY OF ORIGIN COUNTRY
CODE NUMBER DATE

(14) THE APPLICANT RESORTS TO POSTPONEMENT OF FEE PAYMENT PROVIDED FOR IN ART. 162.
OF THE PATENTS ACT 11/86

(15) AGENT / REPRESENTATIVE : NAME AND FULL POSTAL ADDRESS (IF I.P. AGENT, NAME AND CODE) (TO BE FILLED IN
ONLY BY PROFESSIONALS) X

PEDRO OJEDA GARCIA, CALLE SERRANO, 113 - 28006 MADRID

(16) LIST OF ACCOMPANYING DOCUMENTS SIGNATURE OF APPLICANT OR REPRESENTATIVE
X DESCRIPTION OF No. OF PAGES 18 REPRESENTATION DOCUMENT
X CLAIMS No. OF PAGES 2 X RECEIPT FOR PAYMENT OF APPLICATION FEES
X DRAWINGS No. OF PAGES 2 COMPLEMENTARY INFORMATION SHEET
LIST OF SEQUENCES No. OF PAGES PROOFS OF DRAWINGS
X ABSTRACT SURVEY QUESTIONNAIRE
PRIORITY DOCUMENT X OTHERS: AUTHORIZATION (illegible signature)

TRANSLATION OF PRIORITY DOCUMENT (SEE COMMUNICATION)

NOTIFICATION REGARDING PAYMENT OF CONCESSION FEE SIGNATURE OF OFFICIAL
Notice is given that this application shall be regarded as withdrawn if the concession fee fails
to be paid; three months are provided for paying this fee starting from the publication of the
announcement of the concession in the BOPI plus the ten days stated in art. 81 of R.D 2245/1986 (illegible signature)

DIRECTOR OF THE SPANISH OFFICE OF PATENTS AND TRADEMARKS

APPLICATION FOR INVENTION PATENT

12

21 APPLICATION NUMBER
P200101710

31 NUMBER PRIORITY DATA
 32 DATE 33 COUNTRY

22 DATE OF FILING

62 PATENT OF WHICH THIS IS
DIVISIONARY

71 APPLICANT(S)
CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

ADDRESS **SERRANO 117 - 28016 MADRID** NATIONALITY **SPANISH**

72 INVENTOR(S) **JOSE MANUEL ANDREU MORALES, JOSE FERNANDO DIAZ PEREIRA AND MARIA ISABEL BARASOAIN BLASCO**

51 Int. Cl.

GO1N 33/50

GRAPHIC (SOLELY FOR INTERPRETING ABSTRACT)

54 TITLE

**DETECTION AND EVALUATION METHOD FOR MIMETIC
COMPOUNDS OF PACLITAXEL**

57 ABSTRACT

**DETECTION AND EVALUATION METHOD FOR MIMETIC COMPOUNDS OF
PACLITAXEL**

A large part of cytostatics, among them paclitaxel (Taxol ®) and other recently discovered substances that mimic its antitumour effects, have cellular microtubules as their target. The present invention is a high-efficiency homogeneous test based on the use of stabilized microtubules and fluorescent taxoids for detecting any substances that can substitute paclitaxel in its binding site in microtubules and potentially constitute anticancer agents.

TITLE:

5 DETECTION AND EVALUATION METHOD FOR MIMETIC COMPOUNDS OF
PACLITAXEL

SECTOR OF THE ART:

10 Pharmaceutical sector. Antitumour agents. High-efficiency homogeneous test
for the detection of substances that can substitute paclitaxel in its binding site in
microtubules and therefore with potential activity as antitumour agents.

STATE OF THE ART:

15 Paclitaxel (Taxol ®), a compound much used in chemotherapy of cancer,
displays side effects just as other anticancer agents do. This diterpenoid
compound was originally extracted from the bark of a plant, *Taxus brevifolia*, a
slow-growing species which entailed a problem of the lack of a cheap and
available source of paclitaxel. The paclitaxel currently used is a semi-synthetic
product starting from a precursor extracted from the leaves of yew trees.
20 Moreover, paclitaxel displays problems of extreme insolubility. So, although
paclitaxel is a chemotherapy agent with considerable biological activity, the
discovery of new sources of paclitaxel or of mimetic compounds of paclitaxel
has a decisive utility.

25 Paclitaxel promotes the assembly of $\alpha\beta$ -tubulin in microtubules by preferential
binding to assembled tubulin rather than to unassembled tubulin. Its effect is
related to that of the GTP nucleotide, with important differences. The GTP binds
to one end of the tubulin dimer making contact with the following dimer along
each protofilament forming the microtubule, while the paclitaxel binds to one
side of the of β -tubulin close to the contact with the following protofilament; in
30 the α -tubulin, the zone corresponding to the binding cavity to paclitaxel is
occupied by a loop of the peptide chain (Nogales, E.). The unassembled tubular
dimers bind the GTP and the binding site is hidden by the assemblage; while

the binding site to paclitaxel exists only in assembled tubulin. The hydrolysis of GTP permits disassemblage and regulation of the microtubules systems. Nevertheless, the activation of the tubulin by paclitaxel is permanent, thus stabilizing the microtubules.

5 The suppression of the dynamics of cellular microtubules by paclitaxel is a primary cause of the inhibition of cell division and of the death of tumour cells (Jordan, M.A. and Wilson., L.). A number of different natural substances, including epotilones (Bollag, D.M., et al.), discodermolide (Ter Haar, E., et al.), eleuterobine (Long, B.H. et al.) and laulimalide (Mooberry, S.I., et al.) imitate the
10 cytotoxic effects of paclitaxel, apparently becoming bound to its site in the microtubules. Each of these substances was discovered by means of different tests for activities similar to that of paclitaxel.

Some patents describe methods for identifying compounds with activities similar to that of paclitaxel. The American patent US 5340724 (Upjohn Co.) describes a
15 method of using paclitaxel-dependent cells (Tax 2-4 CHO) and detecting their growth. The application PCT WO9420134 (Columbia University) provides two monoclonal antibodies produced by two hybridomes which are capable of becoming bound to paclitaxel and to its analogues, as well as their use for determining the presence and quantity of paclitaxel or its biologically active
20 derivatives. Another patent application, PCT WO0056894 (Cytoclonal pharmaceuticals, Inc.), describes the DNA sequences that code the beta tubulin of different species of fungi of the genus Pestalotiopsis; these purified DNA segments are used for detecting compounds with antitumour activity. Another application, PCT WO 9953295 (California University), consists of a method for
25 the detection of agents that modulate the depolymerisation of microtubules, bringing into contact polymerized microtubules, a protein which depolymerizes them and the substances to be tested in the presence of ATP or GTP and detecting the formation of monomers, dimers or oligomers of tubulin by means of different methods such as change of fluorescence (DAPI), centrifugation, etc.
30 Nevertheless, in contrast with other important biological targets, so far there has not been any standard test for directly detecting and measuring any other

ligands capable of replacing paclitaxel in its binding site in the microtubules.

Methods based on luminescence are very useful for these purposes.

Fluorescent, hydrosoluble and active derivatives of paclitaxel, bound to an intermediate of alanine in the non-essential position 7 (Souto, A.A., et al.) are

5 specific probes for the binding site of paclitaxel to microtubules (Evangelio, J.A. et al.). These fluorescent taxoids have mainly been used for localizing subcellular binding sites of cytotoxic taxoid to microtubules of the pole of the spindle and to centrosomes (Abal, M.A. et al.), as well as for measuring the fast kinetics of binding and of dissociation of the paclitaxel site exposed in
10 microtubules (Diaz, J.F. et al.).

The primary objective of this invention is the development of a homogeneous fluorescent test of ligand binding to the paclitaxel site in microtubules, which permits high-efficiency detection of new paclitaxel mimetics. The method is based upon the combination of two components, a target and a probe. The

15 target consists of microtubules assembled in vitro, which are stabilized by means of chemical cross-linking and conserved in liquid nitrogen. This conservation method is novel. Used as probe are fluorescent derivatives of paclitaxel, which are specifically bound to the microtubules (patents US 2121549, ES 2105983, WO9719938, Consejo Superior de Investigaciones
20 Científicas) (Diaz, J.F. et al.).

The applications of this method are: search for new antitumour agents starting from libraries of natural and synthetic extracts and compounds; evaluation of chemical modifications of series of existing compounds (including paclitaxel, epotilone, discodermolide, euterobine, laulimalide); valuation of content in active
25 taxanes in natural sources; biological and oncological research.

DESCRIPTION OF THE INVENTION

Brief description of the invention

The binding site of microtubules to paclitaxel also binds other recently
30 discovered ligands having antitumour activity. In the present invention, a high-efficiency homogeneous test has been designed for the detection of paclitaxel

biomimetics based on the displacement of the fluorescent taxoid 7-O-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonyl)-L-alanyl]Paclitaxel of its binding site in diluted solutions of conserved microtubules.

5 The detection method forming the object of the present invention and which is claimed is based on the combination of the two components, the target, which consists of microtubules assembled in vitro, which are stabilized by means of chemical cross-linking and conserved indefinitely frozen in liquid nitrogen until they are used, this method of conserving the microtubules also being claimed in the present invention, and the probe, which consists of the said fluoresceinated
10 derivative of paclitaxel which is specifically bound to the microtubules.

The method consists of the addition of the substances (non-fluorescent) to test to multiple aliquots of a diluted solution of the target and the probe in multi-well microplates. The substances to test can be compounds of the families of discodermolide, eleuterobine, sarcodicitine, epotilone and paclitaxel. This
15 method can also have application for measuring active paclitaxel-type contents of natural sources and for the high-efficiency detection of new biomimetics of paclitaxel.

The probe bound to the target possesses a much greater fluorescence anisotropy value than that of the free probe; displacement by any competitor
20 substances of the interaction of the probe (reference ligand) with the target is detected by means of the drop in fluorescence anisotropy of the probe with a microplate fluorescence polarization reader. Alternatively, use is made of the drop in resonance energy transfer (RET) of the probe bound to a rhodaminated acceptor ligand, 7-O-[N-(4'-tetramethylrhodamine-carbonyl)-L-alanyl-] Paclitaxel
25 or the change in intensity of fluorescence of the probe 7-O-[N-(4'-fluoresceincarbonyl)-L-alanyl-] Paclitaxel. This method has application in the development of tools for conducting tests in oncological and/or biological research.

Also forming an object of the present invention is the method for conserving the
30 microtubules indefinitely. This method consists of dialyzing the cross-linked microtubules against a conservation buffer and cryopreserving them.

Detailed description of the invention

With the aim of establishing an effective test of competition based on fluorescence for the binding of ligand to the paclitaxel site in microtubules, the changes in the fluorescent properties of the probe 7-O-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonyl)-L-alanyl]Paclitaxel (Flutax-2; 10) on the specific binding to microtubules were investigated. Flutax-2 was preferred to the analogous Flutax-1 with non-fluorated fluorescein for its superior photostability and acid pK (making the di-anion strongly fluorescent at neutral pH values). Methods of fluorescence anisotropy and of resonance energy transfer (RET) were investigated, along with methods of emission intensity (with Flutax-1). Since the microtubules are bound to Paclitaxel and to Flutax with great affinity, low concentrations of binding sites were necessary in order to detect competitors of lower affinity. These binding sites, stabilized by dilution, were provided by gently cross-linked microtubules (see for example: Evangelio, J.A. et al.; Diaz, J.F. et al.)

Validation of the probe and target. A) Measurement of the specific binding of Flutax-2 to microtubules by means of fluorescence anisotropy and its cancellation by paclitaxel

The intensity of fluorescence of Flutax-2 changes very little with the binding to microtubules. There is a small change in the excitation maximum from 494nm to 495nm (isosbestic point at 500nm) and a blue shift in emission from 523nm to 520nm (not shown here; isosbestic point at 525nm; Diaz, J.F. et al.). Nevertheless, the fluorescence polarization of Flutax-2 increases significantly as a result of the binding. The excitation anisotropy spectrum of a 50nM solution of microtubule sites / Flutax-2 was compared with the spectrum of a similar solution in which the binding sites were blocked with an excess of paclitaxel and with free Flutax-2. Both the negative anisotropy of the 329nm band and the positive anisotropy of the lower energy excitation transition (495nm) of the difluoro-fluorescein are specifically increased by the binding of Flutax-2 to microtubules. The anisotropy values determined for the 495nm band (emission

520nm; GAB buffer containing glycerol, 25°C) were: free Flutax-2 (50nm), $r_{\min} = 0.055$; in the presence of microtubules blocked with paclitaxel, $r = 0.060$; Flutax-2 specifically bound to the microtubules, $r_{\max} = 0.29$ (the last was determined by valuation of 50nm Flutax-2 with growing concentrations of microtubules). These changes are consistent with a strong immobilization of the fluorophore by the binding. As well as the anchorage of Flutax-2 via its paclitaxel residue, an interaction of the fluorescein di-anion with a cation residue of microtubules, possibly Arg 282 of β -tubulin, has also been proposed (Evangelio, J.A., et al., see Fig. 10 in Diaz, J.F. et al.).

10 A binding isotherm of Flutax-2 to microtubules, determined on the basis of the change of anisotropy of the ligand, indicates an equilibrium constant of the binding with value $K_b = 11.5 \pm 0.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ in GAB-GDP buffer at 25°C (this is not significantly different from the values previously obtained by centrifugation (Diaz, J.F., et al.)). The binding of Flutax-2 at these concentrations is entirely annulled by 10 μ M paclitaxel.

On the basis of these results, of the observation of the capacity of Flutax-2 to substitute ^3H -Paclitaxel in its binding site, and of the previous results discussed in a detailed kinetic study (Diaz, J.F. et al.), Flutax-2 can be considered a genuine probe for the paclitaxel binding site of microtubules.

20 Validation of the probe and target. B) Detection of the binding of Flutax-2 to microtubules by means of energy transfer (RET) to another fluorescent taxoid and its cancellation by paclitaxel

The closest distances between binding sites to paclitaxel in β -tubulin sub-units of microtubules are ca. 5.5, 8 and 9.5nm (Nogales, E. et al.), an appropriate interval of distance for RET from fluorescein to fluorophores of rhodamine. The displacement of the donor or acceptor from its binding sites by another non-fluorescent ligand would suppress emission by the acceptor due to excitation of the donor. The emission spectrum (excitation at 460nm) of binding sites of 50nM microtubules with 10nM Flutax-2 and 40nM Rotax (7-O-[N-(4'-tetramethylrhodamine-carbonyl)-L-alanyl-] Paclitaxel (Evangelio, J.A. et al.) showed a sensitized emission peak of Rotax, as well as emission of Flutax-2.

When the binding sites were blocked with paclitaxel, the emission of fluorescein increased (it did not go out) and changed from 521 to 524nm, while the contribution of rhodamine fell to a level (a shoulder) similar to that of the non-sensitized emission of Rotax at 582nm. This experiment indicated the possibility of detecting a ligand binding to the paclitaxel site by the drop in RET.

Validation of the probe and target. C) Detection of the binding of Flutax-1 to microtubules by means of energy transfer (RET) to another fluorescent taxoid and its cancellation by paclitaxel

Using Flutax-1 it is possible to characterize the displacement by variation of the intensity of fluorescence.

Fluorescent test for detection and evaluation of ligands interacting with the binding site of paclitaxel in microtubules

Using Flutax-2 as a reference probe for the binding site to paclitaxel, the binding of other non-fluorescent ligands which displace Flutax-2 from the microtubules (see Figure 1) can easily be measured by the changes in their own fluorescence properties in a competition test. The change of fluorescence anisotropy, which was analyzed in 96-well plates with a microplate reader, was used. Figure 2 shows how the paclitaxel and the docetaxel effectively decrease the fluorescence anisotropy of solutions of 50 nM Flutax-2 / 50 nM microtubule sites. The numerical analysis of the displacement isotherms (see example) indicated that paclitaxel and docetaxel bind to microtubules with equilibrium binding constants of $(3.7 \pm 1.5) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (four determinations) and $(6.0 \pm 2.3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (two determinations), respectively, at 25°C. The ratio of affinities of docetaxel to paclitaxel was 2.7 ± 0.2 on the basis of the individual experiments. An affinity of docetaxel twice that of paclitaxel is in accordance with a previous direct determination (Diaz J.F and Andreu, J.M.). The affinity of paclitaxel is of the same order of magnitude as the values previously determined for paclitaxel (Parness J and Horwitz, S.B.), 2-dibenzoyl-2-(m-aminobenzoyl) paclitaxel (Han, Y. et al.) and 3'-N-m-aminobenzamide-3'-N-debenzamide-Paclitaxel (Li, Y. et al.). Baccatine III, so far generally considered to be an inactive compound, entirely inhibited the anisotropy of microtubule Flutax-2, though at total

concentrations approximately 200 times greater than paclitaxel (see Fig. 1). The analysis of the displacement data indicated that baccatine III is recognized by the paclitaxel binding site of microtubules with an equilibrium constant of $(1.5 \pm 0.5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (seven determinations). Baccatine III is equivalent to the taxane ring system, in which the group C-13 OH substitutes the paclitaxel side chain (see chemical structures in Fig. 2). The C-13 side chain has previously been considered as an essential determinant for recognition of paclitaxel. Nevertheless, the methyl ester of the C-13 side chain was, within the limits of its solubility, inactive for displacing Flutax-2. The results indicated an equilibrium constant of less than 10^3 M^{-1} for this analogue of the C-13 side chain separated from the rest of the molecule (see Fig. 2.2, determinations).

In a series of control measurements, the displacement of the interaction of ^3H -paclitaxel with microtubules by baccatine III and Flutax-2 was evidenced by sedimentation and scintillation count. The results of these measurements (see Example) were compatible with those of fluorescence anisotropy tests, except for an apparent affinity of Flutax-2 seven times lower. This confirmed that baccatine III is recognized by the paclitaxel binding site of microtubules. Nevertheless, with the aim of having the majority of the radioactive ^3H -paclitaxel tracer in solution, instead of being adsorbed onto the polycarbonate tube of the table-top ultracentrifuge, it was necessary to include 1 mg mL^{-1} of bovine serum albumin, which binds the paclitaxel (keeping it available for interaction with the microtubules) and also the Flutax-2 (decreasing its apparent affinity). These adsorption processes make it impossible to have any direct rigorous measurement of the affinity of the binding of paclitaxel to microtubules in our hands, and therefore of the affinity of its competitors using paclitaxel as a reference ligand in these diluted tests. The additional disadvantages of the binding tests of ^3H -paclitaxel in comparison with the homogeneous test of the anisotropy of fluorescent taxoid are the operations of centrifugation, separation and radioactive measurement that are required.

Use of the fluorescence anisotropy test in microplate in comparison with other methods for detecting paclitaxel mimetics

The fluorescence method for the detection of binding of ligands to the paclitaxel site of microtubules developed in this work constitutes a first homogeneous test for any other substance acting on this important antitumour target. Its simplicity compares favourably with screening methods based on the stabilization of microtubules (Bollag, D.M., et al., www.cytoskeleton.com) and with the competitive tests using radioactively marked paclitaxel (above, Bollag, D.M. et al., Diaz, J.F. and Andreu, J.M.). The specific monoclonal antibodies of taxane offer a possibly unsurpassable sensitivity for the determination of medicinal contents and closely related compounds (Grothaus, P.G. et al; O'Boyle, K.P.; Bicamumpaka, C and Page, M.), nevertheless, they can fail to recognize ligands that are not chemically related to the paclitaxel binding site of the microtubule. Since multiple samples can be easily analyzed with the method of polarization by fluorescence, this test constitutes a useful tool for the evaluation of the binding affinity of recently designed compounds of the families of discodermolide, eleuterobine, epotilones and paclitaxel. It is also applicable to the measurement of paclitaxel-type active contents of natural sources, and for the high-efficiency investigation of new biomimetics of paclitaxel, in a complementary mode to the cellular explorations for mitotic inhibitors, like those used in the discovery of monastrol (Mayer, T.U. et al.). An interesting property of the fluorescence anisotropy test is its sensitivity for the detection of ligands of medium affinity. This is possible due to the combination of a highly fluorescent taxoid (Flutax-2) with stabilized microtubules, permitting the considerable dilution needed for the effective displacement of the probe through the weakest ligands, which would otherwise not be detected. An example is the detection of baccatine III binding, which provides a new view of the molecular recognition of paclitaxel by microtubules.

BIBLIOGRAPHY

- Abal, M.A., Souto, A.A.; Amat-Guerri, F., Acuña, A.U., Andreu, J.M. and Barasoain (2001) *Cell Motil. Cytosk.* 49, 1-15.
- Andreu, J.M., Perez-Ramirez, B., Gorbunoff, M.J., Ayala, D. and Timasheff,

- S.N. (1998) *Biochemistry* 37, 8356-8368.
- Bicamumpaka, C. and Page, M. (1998) *J. Immunol. Meth.* 212, 1-7.
- Bollag, D.M., McQueney, P.A., Zhu, J., Henses, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Diaz, J.F. and Andreu, J.M. (1993) *Biochemistry*, 32, 2747-2755.
- 5 Diaz, J.F., Strobe, R., Engelborghs, Y., Souto, A.A. and Andreu, J.M. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 26265-26276.
- Evangelio, J.A., Abal, M., Barasoain, I., Souto, A.A., Lillo, M.P., Acuña, A.U., Amat-Guerri, F. and Andreu, J.M. (1998) *Cell Motil. Cytoskel.* 39, 73-90.
- Grothaus, P.G., Bignami, G.S., O'Malley, S., Harada, K.E., Byrnes, J.B., Waller, D.F., Raybould, T.J., McGuire, M.T. and Alvarado, B. (1995) *J. Nat. Prod.* 58, 1003-1014.
- 10 Han, Y., Chaudhary, A.G., Chordia, M.D., Sackett, D.L., Perez-Ramirez, B., Kingston, D.G. and Bane, S. (1995) *Biochemistry* 35, 14173-14183.
- Jiminez-Barbero, J., Souto, A.A., Abal, M., Barasoain, I., Evangelio, J.A., Acuña, A.U. Andreu, J.M. and Amat-Guerri, F. (1998) *Bioorg., Med. Chem.* 6, 1857-1863.
- 15 Jordan, M.A. and Wilson, L. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 123-130.
- Lackowitz, J.R. (1999) Principles of fluorescence spectroscopy. Kluwer/Plenum, New York, N.Y.
- 20 Li, Y, Edsall, R. Jr., Jagtap, P.G., Kingston, D.G.I. and Bane, S. (2000) *Biochemistry* 39, 616-623.
- Long, B.H., Carboni, J.M., Wasserman, A.J., Cornell, L.A., Casazza, A.M., Jensen, P.R., Lindel, T., Fenical, W. and Fairchild, C.R. (1998) *Cancer Res.* 58, 1111-1115.
- 25 Mayer, T.U., Kapoor, T.M., Haggarty, S.J., King, R.W., Schreiber, S.L., and Mitchison, T.J. (1999) *Science* 286, 971-974.
- Medrano, F.J., Andreu, J.M., Gorbunoff, M.J. and Timasheff, S.N. (1991) *Biochemistry* 30, 3770-3777.
- Mooberly, S.I. Tien, G., Hernandez, A.H., Plubrukam, A. and Davidson, B.S. (1999) *Cancer Res.* 59, 653-660.
- 30 Nogales, E (2000) *Annu. Rev. Biochem.* 69, 277-302.

- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A. and Downing, K.H. (1999) *Cell*, 96, 79-88.
- Nogales, E., Wolf, S.G. and Downing, K. (1998) *Nature* 391, 199-203.
- O'Boyle, K.P., Wang, Y., Schwarz, E.L., Regl, D.L., Eizig, A., Dutcher, J.P.,
 5 Wiernik, P.H. and Horwitz, S.B. (1997) *Cancer* 79, 1022-1030.
- Parness, J. and Horwitz, S.B. (1981) *J. Cell Biol.* 91, 479-487.
- Souto, A.A., Acuña, A.U., Andreu, M.J., Barasoain, I., Abal, M. and Amat-Guerri, F. (1995) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34, 2710-2712.
- Ter Haar, E., Kowalsky, R.J., Lin, C.M., Longley, R.E., Gunasekera, S.P.,
 10 Rosenkrantz, H.S. and Day, B.W. (1996) *Biochemistry* 35, 243-250.

DETAILED DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIGURE 1. A fluorescence micrograph of a typical reaction mixture used in this invention, which consists of stabilized microtubules (100 nM taxoid sites) and
 15 Flutax-2 fluorescent taxoid (100nM). The bar indicates 10 μ m.

FIGURE 2. Competition isotherms of ligands bound to the paclitaxel site of microtubules in GAB-GDP buffer at 25°C. The fluorescence anisotropy of multiple solutions of 50nM Flutax-2 and binding sites of 50nM microtubules with
 20 various concentrations of competitors was measured in duplicate, using a microplate reader. The solid circles, paclitaxel (1); the empty circles, docetaxel; the squares, baccatine III (2); the triangles, methyl ester of the C-13 side chain of paclitaxel (3); the crosses, controls corresponding to DMSO 1% (v/v) without ligand. In this test, each competition curve starts with an anisotropy value
 25 corresponding to two-thirds of bound Flutax-2 molecules, which are progressively reduced by the competitor that substitutes Flutax-2 in the binding sites. The equilibrium binding constant of Flutax-2 is $1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. The lines 1 (short broken) and 2 (continuous) correspond to best fits for the binding of paclitaxel and baccatine to the same site with equilibrium constant values of $K =$
 30 $3.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ and $K = 1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectively; the long broken line is the fit of the data for docetaxel, $K = 8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$; the line of points passing through the

data for the side chain methyl ester is a simulation of a binding of low affinity binding with $K = 7 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (observe that these last data are similar to those for the controls).

5 **EXAMPLE OF EMBODIMENT OF THE INVENTION**

1. Taxoids. Fluorescent probe

Standard concentrated solutions were prepared and were kept at -20°C in a dry atmosphere. The paclitaxel (from the National Cancer Institute, Bethesda, MD) was measured spectroscopically at 273nm following dilution in methanol, using
 10 an extinction coefficient of $1,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Diaz, J.F. and Andreu, J.M.) ^3H -Paclitaxel (4 Ci mmol^{-1}) was obtained from Moravek Biochemicals (Brea, CA), Docetaxel (Taxotere) was supplied by Rhône-Poulenc Rorer (Antony, France). Baccatine III was obtained from Sigma; it was found to be free of impurities by means of HPLC (a 20-80% gradient of acetonitrile in 0.05% of aqueous
 15 trifluoroacetic acid in a C-18 column, monitored at 228nm). An extinction coefficient of baccatine III determined approximately was $900 \pm 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (273nm, methanol). Baccatine III was soluble at the concentrations used in 10mM sodium phosphate, 1mM ethyleneglycol bis (β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetracetic acid (EGTA), 0.1mM GTP, 6mM MgCl_2 , 3.4 M glycerol,
 20 (GAB buffer) pH 6.5 with DMSO at 1%. The methyl ester of the C-13 side chain of paclitaxel was supplied by E. Baloglu and D.G.I. Kingston of the Virginia Polytechnic Institute (Blacksburg, VA). The molar absorptivity of this compound is around $750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 273nm (absorption queue, methanol) and was soluble at 0.75mM in 1% GAB-DMSO buffer.

25 Observe that the added 273nm absorptivities of baccatine III and the methyl ester of the side chain were approximately that of paclitaxel. F. Amat-Guerri of the Instituto de Química Orgánica, CSIC (Madrid, Spain) supplied the fluorescent probe Flutex-2; its purity was checked with HPLC and its concentration was determined spectrophotometrically with 0.5% sodium
 30 dodecyl sulphate (SDS) at neutral pH, using an extinction coefficient of $49,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 496nm (Diaz, J.F. et al.).

2. Target: cross-linked microtubules

Tubulin from bovine brain was purified and stored, and its concentration was measured as has been described (Andreu, J.M. et al.). Prior to its use it was balanced in 10mM sodium phosphate, 1mM EGTA, 0.1mM GTP, 3.5M glycerol pH 6.8, with a Sephadex G-25 gravity column used cold, and it was centrifuged cold for 10 min at 50,000 in a TLA 100.4 rotor (Beckman) cold. The 50 μ M tubulin was made 6mM in MgCl₂ (in other words, glycerol assembly buffer GAB, final pH 6.5) and 1mM GTP, it was assembled in microtubules at 37°C and these were gently cross-linked with 20mM glutaraldehyde, the reaction being stopped with NaBH₄ as has been described (Diaz, J.F. et al.). These cross-linked microtubules have the same specificity, kinetics and stoichiometry for binding to Flutax-2 as the uncross-linked controls; they have a normal morphology under the electron microscope (Diaz, J.F. et al.). The cross-linked microtubules were dialyzed against -0.1 mM GAB nucleotide (GTP or GDP) for more than 16h, cold, in dialysis cassettes (Pierce) and were conserved frozen drop by drop in liquid nitrogen, or at 4°C with 0.05% of sodium azide. This conservation method for the cross-linked microtubules by means of dialysis against a conservation and cryopreservation buffer is claimed in the present invention.

Their concentration of total tubulin was measured after diluting them in 1% SDS using an extinction coefficient of 107,000 M⁻¹ cm⁻¹ at 275nm (Diaz, J.F. and Andreu, J.M.). The concentration of bound tubulin was determined by sedimentation and it was found that it was typically 80-90% of the total. The concentration of binding sites of taxoid was determined by addition of growing concentrations of microtubules cross-linked to 5 μ M Flutax-2 in the GAB-GDP buffer, sedimentation (Diaz, J.F. et al., 50,000 rpm in a Beckman TLA 120 rotor at 25°C) and spectrophotometric measurement of Flutax-2. It was observed that the preparations of cross-linked microtubules bound 0.75 ± 0.05 of Flutax-2 per total tubulin (in other words, a minimum of 95% of the bound tubulin was active binding this ligand). The control measurements using ³H-paclitaxel and liquid scintillation gave values similar to Flutax-2. Once the anisotropy values of

Flutax bound to microtubule and free were determined, the number of sites could also be determined by valuation of diluted solutions of microtubules cross-linked with Flutax-2 (see further below). The concentration of binding sites of taxoids of the preparations of cross-linked microtubules turned out to be stable
5 in liquid nitrogen, decaying at speeds between 0.02 and 0.05 day^{-1} at 4°C (mean lives of five and two weeks respectively). The cross-linked microtubules were used within one mean life starting from the preparation. A fluorescence micrography of these microtubules with Flutax-2 is shown in Fig. 1.

3. Spectroscopic measurements of fluorescence and anisotropy

10 Fluorescence spectra were obtained corrected with a Fluorolog-321 photon count instrument (Jobin Yvon-Spex, Longjumeau, France), with an emission bandwidth of 5nm and excitation of $1\mu\text{m}$ at 25°C . The fluorometric measurements of concentration were made with a Shimadzu RF-540 spectrofluorometer. The anisotropy spectra and measurements were gathered
15 in the Flouolog format-T mode with vertically polarized excitation and were corrected by the sensitivity of each channel with horizontally polarized excitation (Lackowitz, J.R.). The multiple measurements of anisotropy were made with a PolarStar microplate reader (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany) at 25°C . The solutions were excited with 200 pulses of vertically polarized light
20 (band-pass filter 485-P, $480\text{--}492\text{nm}$) and the emission was simultaneously analyzed with vertical and horizontal polarization filters (band-pass 520-P, $515\text{--}550\text{nm}$). The sensitivity of the two channels was adjusted in order to give an anisotropy value of free Flutax-2 (0.055 , polarization 0.080 ; GAB buffer at 25°C) in wells that contained Flutax-2 and not microtubules. The values of well blanks
25 with microtubules and without Flutax-2 were subtracted from the values of fluorescence intensity (the blanks typically represented less than 4% of the measurement).

4. Binding of Flutax to microtubules

First of all, Flutax-2 ($50\mu\text{M}$) was valued with growing concentrations of binding
30 sites provided by cross-linked microtubules, in GAB buffer at 25°C . The fraction of bound Flutax-2 was:

$$[F]_b / [F]_0 = (r - r_{\min}) / (r_{\max} - r_{\min}) \quad [1]$$

where $[F]_b$ and $[F]_0$ are total and bound concentrations of Flutax-2 respectively, r is fluorescence anisotropy measured with the spectrophotometer, the value of r_{\min} is 0.055 and the value of r_{\max} was an adjustable parameter. Assuming a one to one binding, the concentration of free binding sites $[S]$ is:

$$[S] = [S]_0 - [F]_b \quad [2]$$

and the following expression is applied:

$$r = r_{\min} + (r_{\max} - r_{\min}) K_b [S] / (1 + K[S]) \quad [3]$$

Equation 3 was iteratively applied in order to fit the data r vs $[S]$ using different starting values of r_{\max} in equations 1 and 2, with a program based on the Marquardt algorithm, from which the best fixed value was obtained of $r_{\max} = 0.29$. The control measurements with binding sites of microtubules blocked by 10 μ M paclitaxel gave values of r very close to r_{\min} , within an $[S]_0$ interval from 0 to 100 nM. The cross-linked microtubules (50-100nM of total tubulin) were afterwards valued with known concentrations of Flutax-2. The binding was determined as:

$$[F]_b / [T]_0 = [F]_0 (r - r_{\min}) / [T]_0 (r_{\max} - r_{\min}) \quad [4]$$

where $[T]_0$ is the concentration of total tubulin and r_{\max} and r_{\min} have the previously determined values. The concentration of free Flutax-2 is:

$$[F] = [F]_0 - [F]_b \quad [5]$$

The binding equation for independent sites

$$[F]_b / [T]_0 = n K_b [F] / (1 + K_b [F]) \quad [6]$$

was iteratively fitted to the data with a program based on the Marquardt algorithm in order to obtain the best fixed values of n , the number of binding sites of Flutax-2 per total tubulin, and K_b , and the binding equilibrium constant. When these procedures were repeated using the polarization plate reader, instead of the spectrofluorometer, values of r_{\max} were obtained of 0.245 (with Costar 3599 plates) and 0.27 (with Nunc 267342 black plates), with values of K_b and n within experimental error.

5. Measurements of ligand binding to the paclitaxel binding site of microtubules by displacement of Flutax-2

These competitive measurements were made with the plate polarization reader. A solution of known concentrations of binding sites of microtubule and Flutax-2, both close to 50nM, in GAB-GDP buffer, was freshly prepared starting from the concentrated reserves of cross-linked microtubules and Flutax-2. It was
 5 dispensed in aliquots of 200µL (final volume) at room temperature in 96-well plates (Costar cat. No. 3599, the wells at the edges were not used). The plates were selected checking that Flutax-2 remained in solution instead of being adsorbed onto the polystyrene, measuring the contents of the wells in the spectrofluorometer (90% recovery). The ligands to test were added in small
 10 volumes of DMSO (concentration of final DMSO 2% v/v) in order to make the desired duplicated concentrations. A check was also made that the paclitaxel was not adsorbed onto the plate during the test, using ³H-Paclitaxel and a scintillation counter. The wells without protein and without Flutax-2 were included for calibration and background measurements respectively (see
 15 anisotropy measurements, above). The plates were stirred by rotation for 10 minutes and were measured twice within 30-90 minutes following balancing at 25°C in the microplate reader. The anisotropy data of Flutax-2 was calculated with the evaluation software (BMG) and was traced against the total concentration of the competitor.

20 With the aim of measuring the binding affinity of a ligand (L) which displaces the reference ligand Flutax-2 from its microtubule binding site (S), unitary stoichiometry was assumed, with the fractional binding of Flutax-2 starting from the anisotropy being determined as

$$[F]_b / [S]_0 = [F]_0 (r - r_{min}) / [S]_0 (r_{max} - r_{min}) \quad [8]$$

25 and the following expressions were applied

$$K(F) = [SF] / [S][F] \quad [9]$$

$$K(B) = [SB] / [S][B] \quad [10]$$

$$[F] = [F]_0 - [SF] \quad [11]$$

$$[L] = [L]_0 - [SL] \quad [12]$$

$$30 \quad [S] = [S]_0 - [SL] - [SF] \quad [13]$$

A personal computer program, which implemented the solution to equations (9-

13) starting from the known values of $[F]_0$, $[L]_0$, $[S]_0$ and $K(F)$ was used to find the best value of fit by means of least squares of the equilibrium binding constant of the competitor ligand $K(L)$ to the data $[F]_b/[S]_0$ versus $[L]_0$ (Medrano, F.J et al.; J.F. Diaz, unpublished program Equigra.4). The fitted displacement curve was expressed as anisotropy and traced together with the data (see Fig. 2).

6. Displacement of 3H Paclitaxel of the microtubules by competitor ligands
100nM 3H Paclitaxel, binding sites of 100nM microtubules and the desired concentration of competitor in a final volume of 200 μ L of GAB-GDP buffer which
10 contained 1 mg mL $^{-1}$ of bovine serum albumin (BSA) and 1% DMSO were incubated for 30 min and centrifuged for 10 minutes at 50,000 rpm, 25°C, in polycarbonate tubes in a TLA 100 rotor with a TLX centrifuge (Beckman, Palo Alto, CA). The supernatant fractions and the tubes which contained the sediments were separated and subjected to a count with a liquid scintillation
15 counter. The data was able to be numerically processed in a manner similar to the above section, replacing paclitaxel for Flutax-2.

CLAIMS

1. Method consisting of a homogeneous test for the detection of any antitumour substances substitutive of paclitaxel in the paclitaxel binding site of microtubules, characterized in that:

- it is based on the combination of a target and a probe,
- the substances to test are added to a solution of the target which consists of microtubules and the fluorescent probe bound to the target,
- the displacement of the competitor substances of the interaction of the probe with the target is determined by means of measuring the drop in anisotropy in the variation of intensity of fluorescence of the probe or of the resonance energy transfer of the probe to a suitable acceptor,
- and a biomimetic compound of paclitaxel is identified if a drop in the anisotropy of the fluorescence of the probe is observed or by means of the drop in resonance energy transfer to the probe bound to a ligand.

2. Method in accordance with claim 1, characterized in that the target of this method is microtubules assembled *in vitro* which are stabilized by means of chemical cross-linking and are indefinitely conserved by means of dialysis against a conservation and cryopreservation buffer.

3. Method in accordance with claims 1 and 2, characterized in that the probe of this method is any fluorescent derivative of paclitaxel that is specifically bound to microtubules, including among others

7-O-[N-(2,7-dfluoro-4'-fluoresceincarbonyl)-L-alanyl]Paclitaxel

7-O-[N-(2,7-dfluoro-4'-fluoresceinsulphonyl)-L-alanyl]Paclitaxel

7-O-[N-(4'-tetramethylrhodaminrecarbonyl)-L-alanyl]Paclitaxel

7-O-[N-(2,7-dfluoro-4'-fluoresceincarbonyl)-L-beta-alanyl]Paclitaxel

4. Method in accordance with claims 1 to 3, characterized in that it can be robotized and in that the measurements can be made using plate fluorescence readers.
- 5 5. Use of the method in accordance with claims 1 to 4 for the high-efficiency (HTP) identification of antitumour compounds acting on the binding site of paclitaxel in the microtubules, deriving from natural or synthetic sources.
6. Use of the method in accordance with claims 1 to 5 for the evaluation of new derivatives of taxanes, epotilones, discodermalide, eleuterobine,
10 sarcodicitine and any other ligands of the paclitaxel binding site in the microtubules.
7. Use of the method in accordance with claims 1 to 6 for the evaluation of the content of those active substances in a natural production source.
8. Use of the method in accordance with claims 1 to 7 for the evaluation of
15 new sources for the extraction or preparation of potentially active substances starting from pharmacologically non-active or semi-active precursors.
9. Use of the method in accordance with claims 1 to 8 for the development of tools for conducting of tests in oncological and/or biological research
20 related to cellular microtubules.

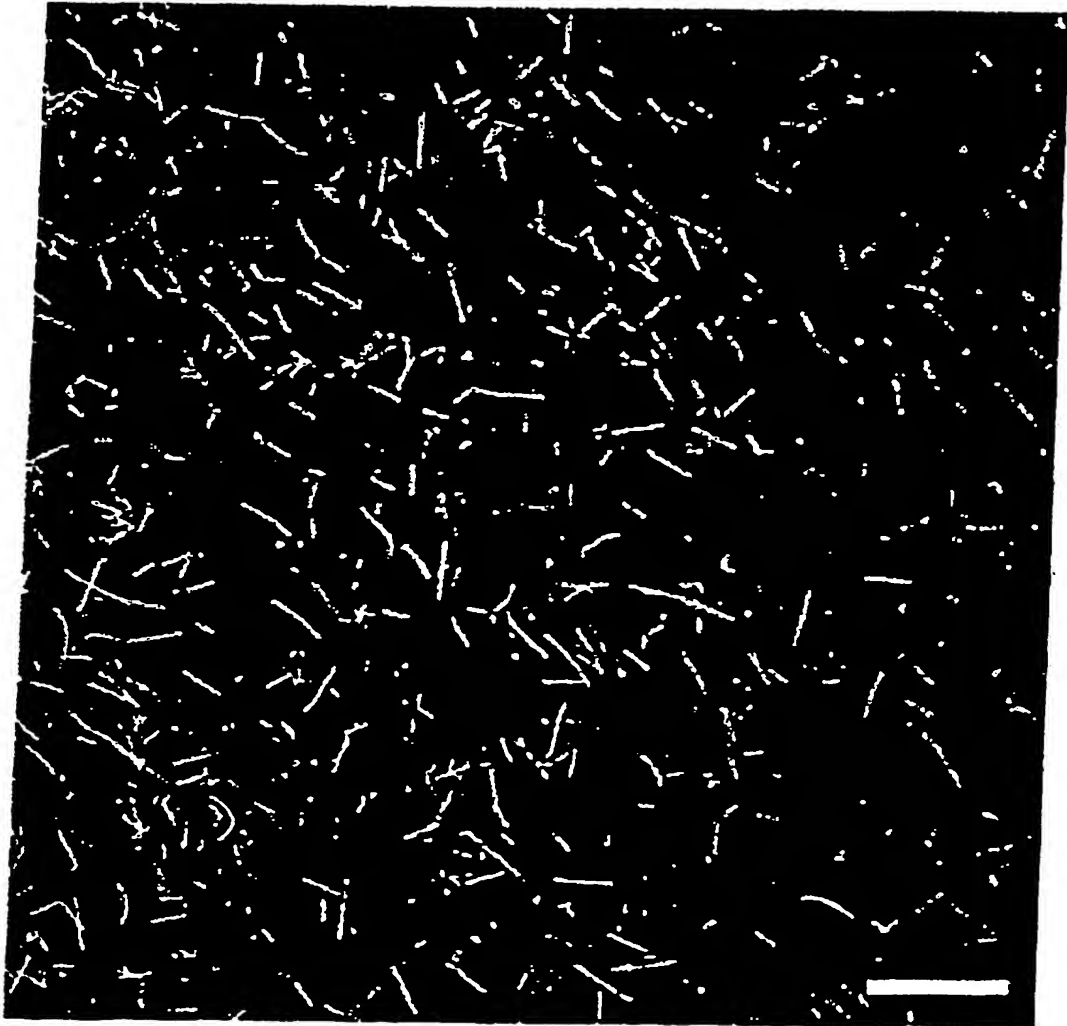
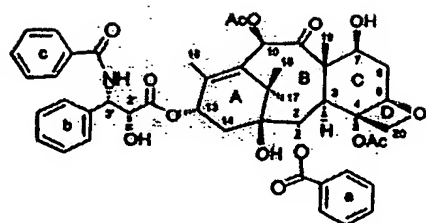
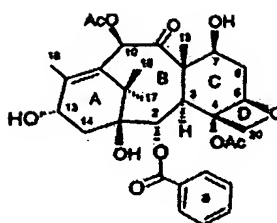


FIG. 1



1 Taxol



2 baccatina III

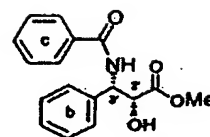
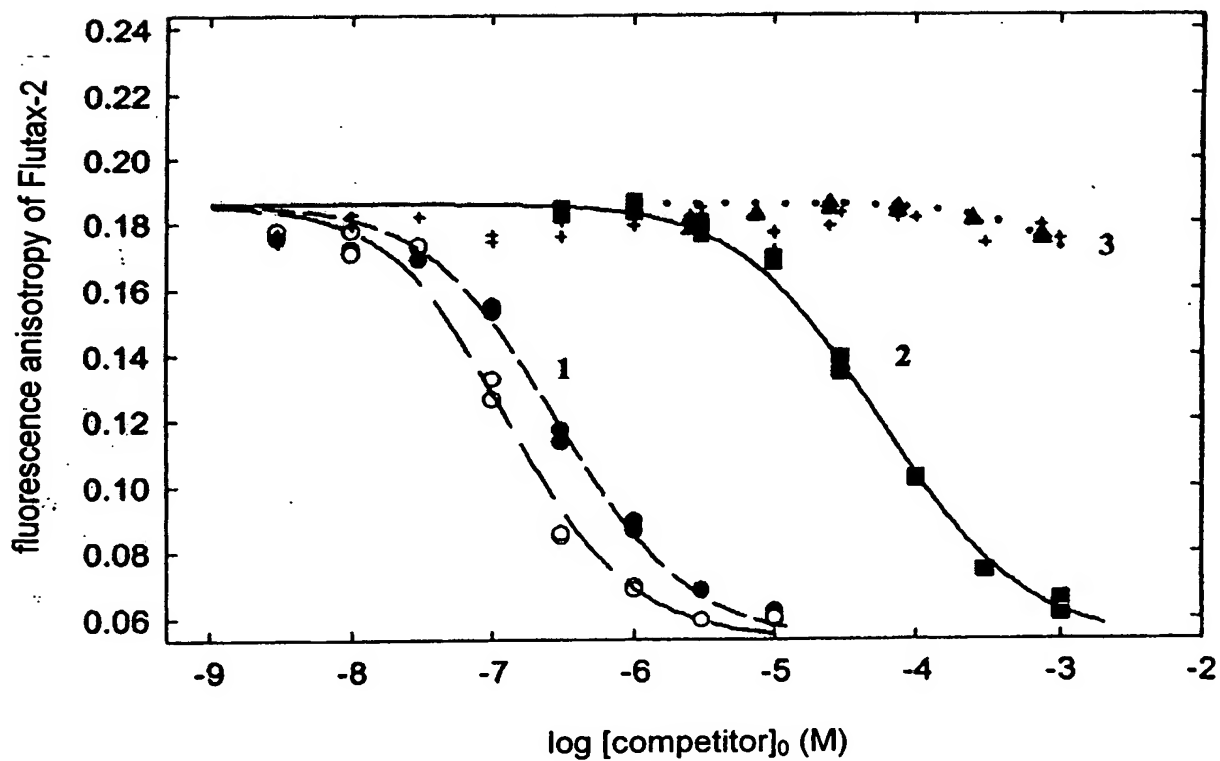
3 methyl ester of the
side chain in C-13

Figura 2

CERTIFICACION

Yo, José Joaquín Latas Díez,
interprete jurado de lengua inglesa,
certifica que la que antecede es traducción
fiel y completa a lengua inglesa
de un documento redactado en castellano.

En Madrid, a 9 de Febrero de 2007

CERTIFICATION

I, José Joaquín Latas Díez, sworn translator of
the English language certifies, that the
preceding translation is a true and complete
version into English of a document written in
Spanish.

Madrid, on the 9 February 2007

José Joaquín Latas Díez

